

Double-confocal scanning microscope.

Patent Number: EP0491289
Publication date: 1992-06-24
Inventor(s): HELL STEFAN DR (DE)
Applicant(s):: HELL STEFAN (DE)
Requested Patent: ☐ EP0491289, B1
Application Number: EP19910121368 19911212
Priority Number(s): DE19904040441 19901218
IPC Classification: G02B21/00
EC Classification: G02B21/00M4A
Equivalents: ☐ DE4040441

Abstract

The invention relates to a scanning microscope having a light source 1, a light detector 13 and two objectives 7 and 8 which are situated on different sides of the object plane 9 and illuminate an object point simultaneously. Means (15) for varying the interference are arranged such that light which has passed through one of the objectives 7 is superimposed on the object and/or on the photoelectric receiver 13 by light which has passed through the objective 8 arranged on the opposite side of the object plane 9, this superimposition being such that interference patterns are formed and it is possible to influence the interference patterns intentionally. A high resolution is achieved with this arrangement.



Data supplied from the esp@cenet database - I2



Europäisches Patentamt
Europ an Patent Offic
Office européen des brevets



Veröffentlichungsnummer: **0 491 289 A1**

12

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

21 Anmeldenummer: 91121368.4

51 Int. Cl.⁵: G02B 21/00

22 Anmeldetag: 12.12.91

30 Priorität: 18.12.90 DE 4040441

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung:
24.06.92 Patentblatt 92/26

84 Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

71 Anmelder: Hell, Stefan Dr.
Comeniusstrasse 20
W-6700 Ludwigshafen(DE)

72 Erfinder: Hell, Stefan Dr.
Comeniusstrasse 20
W-6700 Ludwigshafen(DE)

74 Vertreter: Weiss, Ursula, Dr.
Gluckstrasse 3
W-6800 Mannheim 1(DE)

54 Doppelkonfokales Rastermikroskop.

57 Die Erfindung betrifft ein Rastermikroskop mit einer Lichtquelle 1, einem Lichtdetektor 13 und zwei Objektiven 7 und 8, die auf verschiedenen Seiten der Objektebene 9 liegen und einen Objektpunkt gleichzeitig beleuchten. Interferenzveränderungsmittel (15) sind derart angeordnet, daß Licht, das durch eines der Objektive 7 hindurchgegangen ist, mit

Licht, das durch das auf der gegenüberliegenden Seite der Objektebene 9 angeordnete Objektiv 8 hindurchgegangen ist, am Objekt und/oder am fotoelektrischen Empfänger 13 so überlagert wird, daß sich Interferenzen ausbilden und eine gezielte Beeinflussung der Interferenzen möglich ist. Mit dieser Anordnung wird eine hohe Auflösung erreicht.

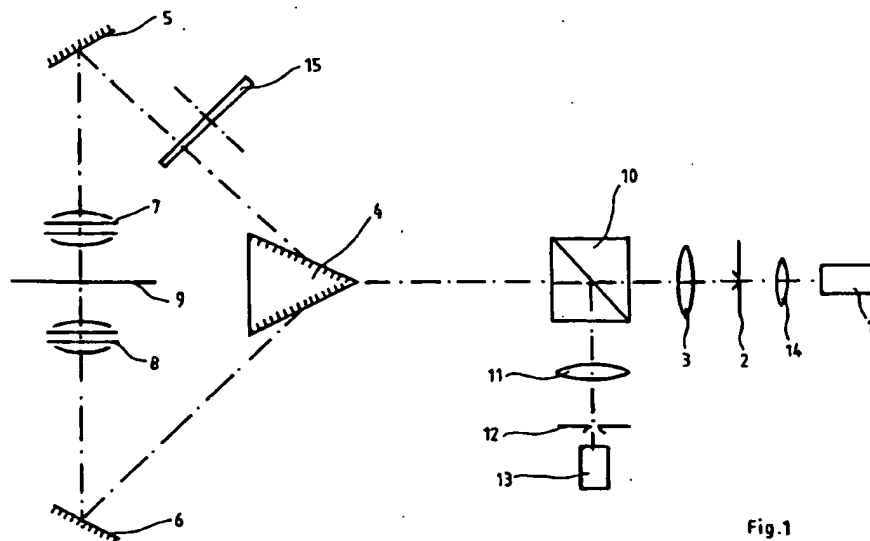


Fig.1

EP 0 491 289 A1

Die Erfindung betrifft ein Rastermikroskop mit mindestens einer Lichtquelle, mindestens einem Lichtdetektor und mindestens zwei Objektiven, die auf verschiedenen Seiten der Objektebene liegen, so angeordnet, daß sie mindestens einen Objektpunkt gleichzeitig beleuchten können, wobei sich auf verschiedenen Seiten der Objektebene mindestens ein Objektiv befindet.

Aus der DE-OS 3918412 ist ein Rastermikroskop für Durch- und Auflicht bekannt, das, in Lichtrichtung gesehen, vor und hinter einer Strahlscanningeinrichtung je einen polarisationsoptischen Strahlenteiler besitzt, wobei der hintere Strahlenteiler in den Strahlengang ein- und ausschaltbar ist. Dieses bekannte Rastermikroskop ist ein mikroskopischer Aufbau, der dazu dient, Proben sowohl im Durchlicht als auch im Auflicht betrachten zu können. Es dient im Gegensatz zu dem erfindungsgemäßen Rastermikroskop nicht zur Verbesserung der Auflösung mittels Interferenz.

Dieses bekannte Rastermikroskop ist nicht dazu geeignet, Interferenz im Fokalebereich der Objektive herzustellen, da der Polarisationsstrahlenteiler zu unterschiedlichen Polarisationszuständen im unteren und oberen Strahlengang führt. Licht unterschiedlicher Polarisation ist nicht interferenzfähig.

In der bisherigen Mikroskopentwicklung wurde besonderen Wert auf die Vergrößerung der Apertur der Mikroskopobjektive gelegt. Damit konnte man die Auflösung in XY-Richtung erhöhen. Bei einer Apertur von $NA = 0,95$ für Trockenobjektive (Aperturwinkel von 71°) scheint zunächst eine technische Grenze erreicht zu sein.

Dies gilt nicht für die Auflösung in Z-Richtung. Für die genaue dreidimensionale Erfassung eines Punktes transparenter oder fluoreszierender Objekte ist aber die Auflösung in Z-Richtung genauso wichtig wie in XY-Richtung.

Die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe besteht darin, ein Rastermikroskop vorzuschlagen, dessen Auflösung möglichst groß ist.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß bei einem Rastermikroskop der eingangs genannten Art Interferenzveränderungsmittel derart angeordnet sind, daß Licht, das durch eines der Objektive hindurchgegangen ist, mit Licht, das durch das auf der gegenüberliegenden Seite der Objektebene angeordnete Objektiv hindurchgegangen ist, am Objekt und/oder am Lichtdetektor so überlagert wird, daß sich Interferenzmuster ausbilden und eine gezielte Beeinflussung der Interferenzmuster möglich ist.

Mit den Interferenzveränderungsmitteln ist es möglich, das entstehende Interferenzmuster gezielt zu beeinflussen, so daß das Interferenzmuster nicht von statistischen Zufällen oder von der Anordnung der Mikroskopteile alleine abhängt.

Vorteilhafterweise tritt an mindestens einem abzubildenden Objektpunkt und/oder an mindestens einem Lichtdetektor zumindest zeitweise konstruktive Interferenz auf.

Vorzugsweise sind zwei Objektive, die auf verschiedenen Seiten der Objektebene angeordnet sind, gegeneinander gerichtet und zur optischen Achse und zueinander zentriert.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform befindet sich in mindestens einer Ebene, die zur Objektebene optisch konjugiert ist, mindestens eine Blende. Diese Blende ist üblicherweise eine Lochblende. Eine Blende wird insbesondere dann vorgesehen, wenn sich die optisch zur Objektebene konjugierte Ebene vor einem Lichtdetektor befindet, der das durch die Blende gegangene Licht registriert und/oder daß diese Blende als Lichtquelle dient.

Gemäß einer weiteren, besonders bevorzugten Ausführungsform, ist das Interferenzveränderungsmittel eine Kompensationsvorrichtung, die am Objekt eine Überlagerung kohärenter oder teilkohärenter Wellenzüge ermöglicht, die jeweils durch verschiedene Objektive ganz oder teilweise getreten sind. Diese Kompensationsvorrichtung ruft insbesondere an mindestens einem abzubildenden Objektpunkt und/oder an mindestens einem Lichtdetektor zumindest zeitweise konstruktive Interferenz der oben genannten Wellenzüge hervor. Unter einer Kompensationsvorrichtung soll eine Vorrichtung verstanden werden, die dazu dient, den Gangunterschied zwischen Wellenzügen, die durch verschiedene Objektive hindurchtreten oder hindurchgetreten sind, zu verändern.

Vorzugsweise besitzt mindestens eine Kompensationsvorrichtung als gangunterschiedveränderndes Element eine zumindest teilweise transparente Platte, die unterschiedliche optische Dicken aufweist und so bewegt wird, daß in einer zeitlichen Abfolge unterschiedliche optisch dicke Teile der Platte in den Strahlengang gebracht werden.

Gemäß einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform ist mindestens eine Kompensationsvorrichtung eine mechanische Translationsvorrichtung, die an mindestens einem optisch wirksamen Teil angebracht ist und den optischen Weg verlängert oder verkürzt. Eine mechanische Translationsvorrichtung ist beispielsweise ein piezoelektrisch oder ein elektromechanisch betriebener Translator. Das optisch wirksame Teil kann insbesondere ein Spiegel, ein Strahl- oder Farbteiler oder ein sonstiges Umlenkelement sein.

In einer anderen Ausführungsform bewirken die Interferenzveränderungsmittel vorzugsweise eine Translationsbewegung der Objektive, so daß die Translationsbewegung eine nicht verschwindende Komponente in Ausbreitungsrichtung der Wellenfront besitzt, wobei sich die Objektive und die

Probe zusammen entlang der optischen Achse bewegen. Interferenzveränderungsmittel verschiedener Bauart können in ein und demselben Aufbau vorhanden sein.

Vorteilhafterweise verändern die Interferenzveränderungsmittel die Interferenzmuster schnell oder auch langsam. Insbesondere verändert die Kompensationsvorrichtung den Gangunterschied zwischen den Wellenzügen, die durch das eine Objektiv hindurchgehen oder hindurchgegangen sind und den Wellenzügen, die durch das andere Objektiv hindurchgehen oder hindurchgegangen sind, schnell oder auch langsam. Die Translation der Objektive kann ebenfalls entweder schnell oder auch langsam erfolgen.

Gemäß einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform wird die Veränderung der Interferenzmuster periodisch durchgeführt, verändert die Kompensationsvorrichtung den Gangunterschied zwischen den Wellenzügen, die durch das eine Objektiv hindurchgehen oder hindurchgegangen sind, und den Wellenzügen, die durch das andere Objekt hindurchgehen oder hindurchgegangen sind, periodisch, oder die Objektive führen eine periodische Bewegung durch.

Vorzugsweise ist mindestens ein Interferenzveränderungsmittel mit der Steuer- und/oder Regелеlektronik der Rasterung und/oder mit der Bildaufnahmeelektronik in ihrer Funktion rückgekoppelt und/oder abgestimmt.

Gemäß einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform wird das Signal mit Hilfe einer Sample-Elektronik (Lock-In, Boxcar-Integrator o. ä.) weiterverarbeitet und der Sample-Takt wird mit Hilfe eines interferometrischen Aufbaus mit mindestens einem Lichtdetektor gewonnen, oder der Sample-Takt ist vom optischen Aufbau unabhängig, oder der Sample-Takt wird von Signalen bezogen, welche die Interferenzveränderungsmittel steuern oder regeln. Zu diesen Steuer- oder Regelsignalen gehören insbesondere die Steuer- oder Regelsignale mechanischer Stellglieder, die an optisch wirksamen Teilen angebracht sind, und die von Kompensationsvorrichtungen.

Als Lichtdetektoren sind Photomultiplier gut geeignet, aber auch TV-Kameras und auch andere Empfänger, die Lichtsignale in elektrische Signale umwandeln.

Weitere besonders bevorzugte Ausführungsformen werden in den weiteren Unteransprüchen beschrieben.

Die Erfindung wird nun anhand der beigefügten Zeichnungen näher erläutert.

Es zeigen:

Figur 1 die schematische Darstellung des Strahlenganges eines Rastermikroskops,

Figur 2 die schematische Darstellung des Strahlenganges einer weiteren Ausführungsform eines

Rastermikroskops,

Figur 3 die schematische Darstellung des Strahlenganges einer anderen Ausführungsform eines Rastermikroskops und

Figur 4 die schematische Darstellung des Strahlenganges einer weiteren Ausführungsform eines Rastermikroskops.

Wie in Figur 1 dargestellt, beleuchtet die Lichtquelle 1 (Laser oder Kurzbogenlampe) die Lochblende 2. Vor dieser Lochblende 2 ist die Linse 14 und hinter dieser Lochblende 2 die Linse 3 vorzugsweise im Abstand ihrer Brennweiten zur Lochblende angeordnet. Die Wellenfront, die den Strahlteilerwürfel 10 passiert, wird von dem Strahlteiler 4 in mindestens zwei zueinander kohärente Teilwellenfronten gespalten und abgelenkt. Unter den Begriff Wellenfront soll auch ein ganzer Wellenzug fallen, d. h. auch mehrere Wellenfronten. Die einzelne Wellenfront steht hier, wie im folgenden als ein erklärendes Beispiel für alle Wellenfronten eines Wellenzuges. Der gemäß Figur 1 nach unten abgespaltete Teil der Wellenfront trifft auf den Spiegel 6 und wird von diesem Spiegel 6 auf das Objektiv 8 gelenkt. Der gemäß Figur 1 nach oben aufgespaltete Teil der Wellenfront wird auf den vorzugsweise symmetrisch zu dem Spiegel 6 angeordneten Spiegel 5 gelenkt. Dieser Spiegel 5 lenkt nunmehr seinerseits den auf ihn auftreffenden Teil der Wellenfront auf das Objektiv 7. Die beiden Objektive 7 und 8 des Mikroskops sind gegeneinander gerichtet angeordnet, vorzugsweise zueinander und zur gemeinsamen optischen Achse zentriert. Die beiden Objektive 7 und 8 fokussieren die auf sie auftreffenden Teilwellenfronten in die Objektebene 9. In der Objektebene 9 befindet sich das zu untersuchende Objekt, so daß der gemeinsame Ortspunkt, auf den die Teilwellenfronten fokussiert werden - im allgemeinen der gemeinsame Brennpunkt - der abzubildende Ortspunkt ist. Das von dort emittierte oder reflektierte Licht wird von den Objektiven 7 und 8 erfaßt und über die Spiegel 5 und 6 und den Strahlteiler 4 dem Strahlteilerwürfel 10 zugeführt. Dieser Strahlteilerwürfel 10 lenkt nun seinerseits das Licht oder einen Teil davon über die vorzugsweise symmetrisch zu der Linse 3 angeordneten Linse 11 in die Lochblende 12. Der Lichtdetektor 13 (Detektor) mißt die Intensität des durch die Lochblende 12 zu ihm gelangenden Lichts.

Im Strahlengang zwischen dem Strahlteiler 4 und dem Spiegel 5 ist die Kompensationsvorrichtung 15 angeordnet, die zur Veränderung des optischen Gangunterschieds zwischen den oberen und unteren Teilwellenfronten der Beleuchtung oder Detektion dient.

Die räumliche Kohärenz der Beleuchtung ist zumindest durch die Lochblende 2 gewährleistet. Darüberhinaus sind die Beleuchtungsteilwellenfront

von oben und die Beleuchtungsteilwellenfront von unten interferenzfähig, weil sie aus der gemeinsamen Lichtquelle 1 hervorgehen. Im Fokalebereich interferieren sie zu einer Punktabbildungsfunktion (PSF) $H(x,y,z)$, die räumlich viel stärker begrenzt ist, als die PSF $h(x,y,z)$ in einem herkömmlichen (konfokalen) Mikroskop. Ist der Gangunterschied zwischen den beiden Beleuchtungswellenfronten gleich null, so ist das Volumen des Hauptmaximums von $H(x,y,z)$ rund 4 mal kleiner als das Volumen des Hauptmaximums von $h(x,y,z)$. Dies bedeutet, daß die wellenoptische Grenze der Auflösung deutlich heruntergesetzt wird. Das erste Intensitätsminimum von $H(x,y,z)$ entlang der optischen Achse liegt etwa eine halbe Wellenlänge, typisch 250 nm, vom absoluten Intensitätsmaximum im Fokuspunkt entfernt. Bei $h(x,y,z)$ hingegen liegt das erste Intensitätsminimum mehr als 1000 nm vom absoluten Intensitätsmaximum entfernt. Analog zur Beleuchtungswellenfront besteht die Detektionswellenfront aus einer Teilwellenfront oben und einer Teilwellenfront unten. Die Teilwellenfronten werden in den Punktdetektor fokussiert, wo sie interferieren und (aus Symmetriegründen) analog zur Beleuchtung eine Abbildung gemäß der Punktabbildungsfunktion $H(x,y,z)$ bewirken.

In dem erfindungsgemäßen doppelkonfokalen Mikroskop ist die quadratische PSF $H^2(x,y,z)$ für die Auflösung verantwortlich. Die Quadrierung schwächt die Nebenmaxima, die durch die Interferenz der oberen und unteren Wellenfronten entstehen. Die in Richtung der optischen Achse verbesserte Auflösung, verbessert auch die effektive laterale Auflösung, da die Trennung der Z-Koordinaten die Auflösung lateraler Charakteristika ermöglicht, die sonst von den lateralen Charakteristika der Ebenen darüber oder darunter überlagert werden. Da beim Rastermikroskop die Abbildung punktweise erfolgt, ist eine Verbesserung der Auflösung in Richtung der optischen Achse mit einer Verbesserung in lateraler Richtung gleichwertig. Das erfindungsgemäße doppelkonfokale Mikroskop besitzt die höchste Auflösung, die ein Fernfeld-Lichtmikroskop haben kann.

Wird das Rastermikroskop, dessen Strahlengang in Figur 1 dargestellt ist, in der Fluoreszenzmikroskopie verwendet, ist der Strahlteilerwürfel 10 ein Farbstrahlteiler, der das kürzerwellige anregende Licht passieren läßt und das längerwellige zur Seite in den Lichtdetektor 13 ablenkt.

Ferner kann zwischen dem Strahlteilerwürfel 10 und dem Strahlenteiler 4 eine Strahlableitvorrichtung angeordnet werden. Der Strahlenteiler 4, der in der Darstellung als Spiegel ausgestaltet ist, kann durch andere Strahlenteiler (Würfel usw.) ersetzt werden. Eine Auflösungsverbesserung gegenüber dem herkömmlichen konfokalen Mikroskop wird auch dann erzielt, wenn nur die Interferenz zwi-

schen der oberen und unteren Detektionsteilwellenfront, oder wenn nur die Interferenz zwischen der oberen und unteren Beleuchtungswellenfront erfolgt.

Im Falle der Fluoreszenzmikroskopie kann in den von dem Strahlenteiler 4 nach oben oder unten abgelenkten Wellenfronten einer der Beleuchtungs- oder Detektionsstrahlengänge mit Hilfe von Farbfiltren ausgeschaltet werden. Dies geht auf Kosten der Auflösung; diese ist aber trotzdem größer als beim konventionellen konfokalen Mikroskop.

Die Kompensationsvorrichtung 15, die beispielsweise eine optische Verzögerungsplatte ist, ist zur optimalen Abstimmung der Interferenz eingebaut, insbesondere so, daß konstruktive Interferenz entsteht. Sie kann entweder wie dargestellt in dem oberen Teil der Wellenfront oder auch im unteren Teil der Wellenfront eingebaut werden. Sie dient insbesondere dazu, solche Abstimmung der Interferenz zu ermöglichen, deren Verzögerung zeitlich schnell veränderbar ist. Diese können mit der Bildaufnahmeelektronik und/oder der Elektronik zur Steuerung und Regelung der Rasterung rückgekoppelt werden.

Falls Objektrasterung durchgeführt wird, befindet sich das Objekt auf einem - hier nicht eingezeichneten - Scan-Tisch, der die Translation des Objekts in möglichst X, Y und Z-Richtung erlaubt. Falls Strahlrasterung durchgeführt wird, bewegt sich vorzugsweise ein geeigneter Scan-Tisch entlang der optischen Achse (Z-Achse).

In Figur 2 ist die schematische Darstellung einer weiteren Ausführungsform eines Rastermikroskops dargestellt, die besonders für die Fluoreszenzmikroskopie geeignet ist, wobei die Teile, die gleich zu den in Figur 1 dargestellten Teilen sind, mit gleichen Bezugszeichen versehen sind.

Das Licht aus der Lichtquelle 1 gelangt durch den Strahlenteiler 10 auf den (geometrischen) Strahlenteiler 4, der die Wellenfront in zwei interferenzfähige Anteile spaltet. Ein Teil davon wird über Umlenkelemente in das obere Objektiv 7 des Mikroskops gelenkt (obere Beleuchtungswellenfront), der andere über Umlenkelemente in das untere Objektiv 8 des Mikroskops (untere Beleuchtungswellenfront). Beide Beleuchtungswellenfronten interferieren in der gemeinsamen Objektebene 9. Das von dort ausgehende Licht wird in entsprechendem Anteil von den Objektiven 7 und 8 gesammelt. Das von dem Objektiv 7 kollektierte Licht (obere Detektionswellenfront) und ebenso das von dem Objektiv 8 kollektierte Licht (untere Detektionswellenfront) gelangen über Umlenkelemente auf den Strahlenteiler 4, der die beiden Detektionswellenfronten zusammenfügt. Die Detektionswellenfronten gelangen über den Strahlenteiler 10 zu der Lochblende 12. Die durch die Lochblende 12 gelangte Lichtintensität wird von einem Lichtdetektor 13 gemessen und

dient als Signal, das heißt als Charakteristikum des abzubildenden Objektpunktes.

Aufgrund des erfindungsgemäßen Aufbaues findet in mindestens einer der zur Objektebene 9 konjugierten Ebene oder in der Objektebene 9 selbst Interferenz der oberen oder unteren Detektions- oder Beleuchtungswellenfronten statt.

Um die Interferenz zu gewährleisten, um die Interferenz kontrolliert durchführen zu können, bzw. um konstruktive Interferenz zu gewährleisten, ist im Strahlengang zwischen dem Strahlteiler 4 und dem Objektiv 7 die Kompensationsvorrichtung 27 und 28 zur Veränderung des Gangunterschieds zwischen den oberen und unteren Wellenfronten vorgesehen. Es ist auch möglich, daß diese Kompensationsvorrichtung im Strahlengang zwischen dem Strahlteiler 4 und dem Objektiv 8 angeordnet ist. Die Kompensation kann wahlweise auch durch die Bewegung bestimmter Bauteile, insbesondere der im folgenden beschriebenen Umlenkelemente durchgeführt werden. Die Kompensationsvorrichtung bzw. die optischen Wegstrecken sind so dimensioniert, daß auf jeden Fall ein hoher Kohärenzgrad zwischen oberen und unteren Wellenfronten vorhanden ist, so daß die Interferenz auf jeden Fall stattfinden kann.

Wie aus Figur 2 erkenntlich, wird der Strahl bei dieser Ausführungsform wahlweise in seinem Durchmesser mit Hilfe der Bausteine 60 und 60', die zwischen dem Strahlteilerwürfel 10 und dem Strahlteiler 4 angeordnet sind, in seinem Durchmesser vergrößert oder verkleinert. Des weiteren passiert er die Strahlableitvorrichtung 50. Wie oben bereits beschrieben, wird die auf den Strahlteiler 4 auffallende Wellenfront in eine obere und eine untere Beleuchtungswellenfront geteilt. Der Strahlteilerwürfel 10 ist im Falle der Fluoreszenzmikroskopie gemäß Figur 2 ein Farbteilerwürfel, der das zu detektierende Licht in den Lichtdetektor lenkt und das beleuchtende dem Strahlteiler zuleitet. Zwischen dem Strahlteiler 4 und dem Objektiv 7 und/oder dem Strahlteiler 4 und dem Mikroskopobjektiv 8 ist mindestens ein Farbteiler angebracht. Gemäß Figur 2 sind es die beiden Farbteiler 20 und 21, die die Detektionswellenfront von der Beleuchtungswellenfront trennen. Diese passieren getrennt je eine Kompensationsvorrichtung 27 bzw. 28, so daß die Beleuchtungs- und die Detektionswellenfront getrennt in ihrer Phase und/oder Amplitude verändert werden können.

Für den Fall, daß das detektierte Licht eine längere Wellenlänge besitzt und die Farbteiler 20 und 21 das längerwellige Licht reflektieren und das kürzerwellige beleuchtende Licht durchlassen, dient die Kompensationsvorrichtung 27 der Kompensation der Beleuchtungswellenfront und die Kompensationsvorrichtung 28 der Detektionswellenfront. Unter Kompensation versteht man die Veränderung

des Gangunterschieds zwischen den Teilwellenfronten und/oder Veränderung der Phase einer Wellenfront.

Analog zu den eben beschriebenen Farbteiler 20 und 21 sind im unteren Strahlengang die Farbteiler 22 und 23 angeordnet. Diese Farbteiler 22 und 23 werden analog zum oberen Strahlengang aufgebaut. Sie sind vorzugsweise aus dem Strahlengang herausnehmbar und/oder durch Farbteiler mit anderen physikalischen Eigenschaften ersetzbar. Weitere Farbteiler oder Farbteilerpaare können zwischen dem Strahlteiler 4 und dem Objektiv 7 analog zu den Farbteilern 20 und 21 installiert werden, wie auch zwischen dem Strahlteiler 4 und dem Objektiv 8, z. B. bei Mehrfachfluoreszenz, um auch Wellenfronten mit einer weiteren Wellenlänge gezielt im Gangunterschied der Teilwellenfronten verändern zu können.

Über das Umlenkelement 5' gelangt die obere Beleuchtungswellenfront auf die Kompensationsvorrichtung 27, die die optische Weglänge oder die Phase der Wellenfront verändert. Über das Umlenkelement 5 gelangt die obere Beleuchtungswellenfront in das Objektiv 7, welches das Licht in die Objektebene 9 fokussiert. Über das Umlenkelement 6' und das Umlenkelement 6 gelangt die untere Beleuchtungswellenfront in das Objektiv 8, welches das Licht ebenso in den gemeinsamen Brennpunkt fokussiert. Im Brennpunkt können die beiden Beleuchtungswellenfronten miteinander interferieren.

Das Objekt befindet sich vorzugsweise auf einer Tischvorrichtung, welche eine Bewegung des Objekts in Z-Richtung, vorzugsweise in allen drei Raumrichtungen erlaubt.

Das vom Objektpunkt ausgehende Licht gelangt in die Objektive 7 und 8, welche die obere bzw. untere Detektionswellenfront ausbilden. Unter dem Begriff "Wellenfront" sollen andere Wellenfronten des gleichen Wellenzuges im allgemeinen miteinbegriffen sein. Im Falle des Fluoreszenzbetriebs gelangt die obere Detektionswellenfront über den Farbteiler 21, die Kompensationsvorrichtung 28 und den Farbteiler 20 auf den Strahlteiler 4, ebenso wie die untere Detektionswellenfront über die Farbteiler 23 und 22 auf den Strahlteiler 4 gelangt. In einem Nicht-Fluoreszenzbetrieb passieren die Detektionswellenfronten die Farbteiler und werden über die Umlenkelemente 5 und 5' bzw. 6 und 6' auf den Strahlteiler 4 gelenkt. Der Strahlteiler 4 fßt die beiden Detektionswellenfronten zu einer zusammen. Über den Strahlteiler 10 gelangt die Detektionswellenfront zur Linse 11. Die Detektionswellenfront wird in eine in der Lochblende 12 zusammenlaufende Kugelwellenfront verwandelt. Die beiden Detektionswellenfronten interferieren in der Ebene der Lochblende 12 miteinander und bilden den Objektpunkt der Objektebene 9 in die Ebene der Lochblende 12 mit vergrößerter Apertur im Sinne

des doppelkonfokalen Mikroskops ab.

Die Anordnung ist im Sinne der Erfindung, wenn am Objekt und/oder am Lichtdetektor Interferenz der Beleuchtungs- oder Detektionsteilwellenfronten stattfindet. Deshalb ist es möglich, eine Detektionswellenfront bzw. eine Beleuchtungswellenfront wegzulassen.

Dazu wird entweder die obere oder die untere Beleuchtungswellenfront unterbrochen. Dies geschieht mit Hilfe eines opaken Hindernisses 45 bzw. 46 in der oberen bzw. unteren Beleuchtungswellenfront. Mit Hilfe eines opaken Hindernisses 47 bzw. 48 in der oberen bzw. unteren Detektionswellenfront wird die obere bzw. untere Detektionswellenfront gestoppt. Hierdurch ist eine einseitige Detektion und eine Beleuchtung mit interferierenden Beleuchtungswellenfronten möglich.

Bei der in Figur 2 beschriebenen Ausführungsform ist die Strahlableinheit so konzipiert, daß der Strahl eine Winkelbewegung bezüglich der optischen Achse durchführt, wobei vorzugsweise die Mitten der Eintrittspupillen 7' bzw. 8' der Objektive 7 bzw. 8 Drehpunkte sind. Aufeinander abgestimmte Ablenkeinheiten können auch zwischen dem Strahlteiler 4 und dem Objektiv 7 bzw. zwischen dem Strahlteiler 4 und dem Objektiv 8 eingefügt werden.

Die Veränderung des relativen Gangunterschieds der oberen und unteren Wellenfronten kann auch durch die schnelle Veränderung der Abmessungen der oberen und unteren Strahlengänge erfolgen, z. B. über eine simultane Bewegung von Umlenkeinheiten 5 und 5' oder der Farbteilerpaare 20 und 21 in Richtung der optischen Achse. Diese Bewegung kann z. B. mit Hilfe piezoelektrischer oder elektromechanischer Stелеlemente erfolgen.

Die Frequenz der Veränderung des Gangunterschieds durch die Kompensationsvorrichtung kann mit Hilfe einer interferometrischen Anordnung erfaßt werden. Das Signal kann als Taktgeber für die Sample-Elektronik (Lock-in, Boxcar-Integrator) benutzt werden.

In Figur 3 ist die schematische Darstellung des Strahlenganges einer weiteren Ausführungsform eines Rastermikroskops dargestellt, wobei die Teile, die den in den Figuren 1 und 2 dargestellten Teilen entsprechen, mit gleichen Bezugszeichen versehen sind. Im folgenden sollen gemäß Figur 3 nur die Teile des Strahlengangs näher erläutert werden, die sich von den bisher beschriebenen Strahlengängen unterscheiden.

Zwischen dem Strahlteiler 10 und dem Strahlteiler 4 ist eine Strahlableinheit angeordnet. Die aus der Lichtquelle 1 über die Lochblende 2 und die Linse 3 durch den Strahlteiler 10 kommende Wellenfront gelangt an den Spiegel 51, der um eine Achse (z. B. senkrecht zur Reflexionsebene)

schnelle Kippbewegungen durchführt. Meistens ist der Spiegel an der Achse eines Drehspulgalvanometers angebracht, das mit Hilfe einer Sinusspannung betrieben wird. Auf diese Weise führt der Strahl nach dem Spiegel 51 eine Kippbewegung in der Reflexionsebene (= Papierebene) durch. Die Linsen 52 und 53 sind so angeordnet, daß der Spiegel 51 in den Spiegel 54 abgebildet wird. Der Spiegel 54 führt eine Kippbewegung durch, die senkrecht zu der des Spiegels 51 angeordnet ist. Die Linsen 55 und 56 bilden den Spiegel 54 und damit auch den Spiegel 51 in die Eintrittspupillen 7' und 8' der Objektive 7 und 8 ab. Der Strahl führt in den Eintrittspupillen 7' und 8' eine Drehbewegung in zwei zueinander senkrechte Richtungen durch. Die Drehpunkte befinden sich in den Eintrittspupillen 7' und 8'. Die Eintrittspupillen 7' und 8', der Spiegel 54 und 51 befinden sich in optisch zueinander konjugierten Ebenen.

Die Bewegungen der Spiegel 51 und 54 werden von den beiden Objektiven 7 und 8 des Mikroskops in der Objektebene 9 in zwei zueinander senkrechte lineare Bewegungen umgewandelt. Auf diese Weise kann das Objekt flächenmäßig abgerastert werden. Wenn man einen der beiden Spiegel auf einer zweiachsigen Mechanik anbringt, z. B. wenn man einen Galvanometerspiegel auf den anderen draufsetzt, so kann man auf einen Spiegel und zwei Linsen verzichten. Dies ist gut für die Ausbeute des detektierten Lichts. Man kann auch dann auf einen Spiegel verzichten, wenn eine Ablenkrichtung durch eine gleichwertige Tischbewegung in der Objektebene 9 ersetzt wird.

Um Interferenz zu gewährleisten, um die Interferenz kontrolliert durchführen zu können bzw. um konstruktive Interferenz zu gewährleisten, ist im Strahlengang zwischen dem Strahlteiler 4 und dem Objektiv 8 mindestens eine Kompensationsvorrichtung 27 bzw. 28 zur Veränderung des Gangunterschieds zwischen den oberen und unteren Wellenfronten vorgesehen. Die Kompensation kann wahlweise auch durch die Bewegung bestimmter Bauteile, insbesondere der Umlenkelemente 25 und 26 durchgeführt werden. Die Kompensationsvorrichtung bzw. die optischen Wegstrecken sind so dimensioniert, daß ein hoher Kohärenzgrad zwischen den oberen und unteren Wellenfronten vorhanden ist, so daß Interferenz stattfinden kann. In Figur 3 ist im Strahlengang zwischen dem Strahlteiler 4 und dem Objektiv 7 die weitere Kompensationsvorrichtung 29 angeordnet.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen dem konfokalen und dem hier beschriebenen doppelkonfokalen Mikroskop besteht darin, daß beim doppelkonfokalen Mikroskop entweder die Beleuchtungswellenfront aus Teilen besteht und von entgegengesetzten Richtungen der optischen Achse einfallen und miteinander interferieren, oder daß die

Detektionswellenfront aus Teilen besteht, die zunächst in entgegengesetzte Richtungen der optischen Achse vom Objekt weggehen und beim Lichtdetektor miteinander interferieren, oder daß beides zugleich zutrifft.

In Figur 4 ist der Strahlengang einer weiteren Ausführungsform eines Rastermikroskops schematisch dargestellt. Diese Anordnung unterscheidet sich von den bisher beschriebenen Ausführungsformen eines Rastermikroskops dadurch, daß die Aufspaltung der Wellenfront in eine obere und eine untere Beleuchtungswellenfront vor der Lochblende erfolgt. Aus diesem Grunde sind zwei Lochblenden 102 und 202 vorhanden, welche jeweils für die obere und die untere Wellenfront zuständig sind. Auch die Detektionswellenfronten werden erst nach dem Passieren der Lochblenden 102 und 202 zusammengeführt. Die Beleuchtungswellenfronten interferieren wie bisher im Objekt, die Detektionswellenfronten im Detektor 13.

Ein weiterer Unterschied zu den bisher beschriebenen Anordnungen besteht darin, daß die beiden Lochblenden 102 und 202 Translationsbewegungen durchführen können und so gegeneinander versetzt werden können.

Die übrigen Bauelemente erfüllen die gleiche Funktion wie bei den anderen Anordnungen.

Die Verschiebung der Lochblende 102 wird vorzugsweise zusammen mit der Linse 101 und/oder dem Spiegel 5 durchgeführt; die Verschiebung der Lochblende 202 wird analog zusammen mit der Linse 201 und/oder dem Spiegel 6 durchgeführt. Das Verschieben der Lochblenden 102 und 202 bewirkt eine gezielte Veränderung des Interferenzmusters und damit eine etwas andere Art der Abbildung.

Alle Strahlteiler können wie bei den anderen Anordnungen auch ein geometrischer (z. B. eckiger Spiegel) oder physikalischer Wellenfrontteiler (z. B. Strahlteilerwürfel) sein, oder aus mehreren, eventuell auch selbständig optisch wirksamen Teilen bestehen. Im Falle von Fluoreszenzmikroskopie kann der Strahlteiler 110 und/oder 210 ein Farbteiler sein.

Der Strahlteiler 4 dient der Aufteilung der vom Laser kommenden Wellenfront in eine obere und eine untere Beleuchtungswellenfront. Das Prisma 4' dient der Umlenkung der unteren Beleuchtungswellenfront hin zu dem Umlenkelement 6'. Von dort gelangt diese über das Umlenkelement 6 und den Strahlteilerwürfel 210 zur Linse 201. Die obere Beleuchtungswellenfront gelangt über die Kompensationsvorrichtung 27, über die Umlenkelemente 5' und 5 und anschließend über den Strahlteilerwürfel 110 zur Linse 101. Die obere Detektionswellenfront gelangt über die Lochblende 102 und die Linse 101 zum Strahlteiler 110, von wo sie über die Umlenkelemente 105 (z. B. Spiegel oder Prisma)

zur Kompensationsvorrichtung 28, und von dort zum Strahlteiler 304 gelangt, wo sie mit der unteren Detektionswellenfront vereinigt wird. Die untere Detektionswellenfront gelangt über den Strahlteiler 210 und das Umlenkelement 206 zum Strahlteiler 304. Die vereinigte Wellenfront gelangt über die Linse 11 zur Lochblende 12.

In dieser Anordnung kann, wie in allen anderen Anordnungen auch, der Strahlteiler 4 sowohl ein physikalischer als auch ein geometrischer Strahlteiler sein, oder auch aus mehreren optisch wirksamen Teilen zusammengesetzt sein. Dies gilt auch für den Strahlteiler 304, der auch durch eine Kombination, wie sie aus 4 und 4' gebildet wird, ersetzbar ist.

Patentansprüche

1. Rastermikroskop mit mindestens einer Lichtquelle (1), mindestens einem Lichtdetektor (13) und mindestens zwei Objektiven (7, 8), wobei sich auf verschiedenen Seiten der Objektebene (9) mindestens ein Objektiv (7, 8) befindet, das zu mindestens einem Objektiv, das sich auf der anderen Seite der Objektebene befindet, gerichtet ist, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Interferenzveränderungsmittel derart angeordnet ist, daß Licht, das durch mindestens eines der Objektive (7) hindurchgegangen ist, kohärent oder teilkohärent überlagert wird mit Licht, das durch mindestens ein Objektiv (8) hindurchgegangen ist, welches sich auf der anderen Seite der Objektebene (9) befindet, so daß die überlagerten Lichtwellen am Objekt und/oder an mindestens einem Lichtdetektor (13) zumindest zeitweise miteinander interferieren und daß eine gezielte Beeinflussung der Interferenz möglich ist.
2. Rastermikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß an mindestens einem abzubildenden Objektpunkt und/oder an mindestens einem Lichtdetektor zumindest zeitweise konstruktive Interferenz auftritt.
3. Rastermikroskop nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß zwei Objektive (7, 8), die auf verschiedenen Seiten der Objektebene (9) angeordnet sind, gegeneinander gerichtet und zur optischen Achse und zueinander zentriert sind.
4. Rastermikroskop nach Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß sich in mindestens einer Ebene, die zur Objektebene optisch konjugiert ist, mindestens

eine Blende (12, 2) befindet.

5. Rastermikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Interferenzveränderungsmittel eine Kompensationsvorrichtung (15, 27, 28, 29) ist, die an mindestens einem abzubildenden Objektpunkt und/oder an mindestens einem Lichtdetektor eine Überlagerung kohärenter oder teilkohärenter Wellenzüge ermöglicht, die jeweils durch verschiedene Objektive (7, 8) ganz oder teilweise getreten sind.
6. Rastermikroskop nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Kompensationsvorrichtung (15, 27, 28, 29) an mindestens einem abzubildenden Objektpunkt und/oder an mindestens einem Lichtdetektor (13) zumindest zeitweise konstruktive Interferenz der Wellenzüge hervorruft.
7. Rastermikroskop nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Kompensationsvorrichtung (15, 27, 28, 29) als gangunterschiedveränderndes Element eine zumindest teilweise transparente Platte besitzt, die unterschiedliche optische Dicken aufweist und so bewegt wird, daß in einer zeitlichen Abfolge unterschiedliche optisch dicke Teile der Platte in den Strahlengang gebracht werden.
8. Rastermikroskop nach Anspruch 5 oder folgende, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Kompensationsvorrichtung eine mechanische Translationsvorrichtung ist, die an mindestens einem optisch wirksamen Teil angebracht ist und den optischen Weg verlängert oder verkürzt.
9. Rastermikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Interferenzveränderungsmittel eine Translationsbewegung der Objektive bewirkt, so daß die Translationsbewegung eine nicht verschwindende Komponente in Ausbreitungsrichtung der sie passierenden Wellenfront besitzt, wobei sich die Objektive und die Probe zusammen bewegen.
10. Rastermikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Interferenzveränderungsmittel die Interferenzen schnell oder auch langsam verän-

dern.

11. Rastermikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Veränderung der Interferenzen periodisch durchgeführt wird, daß die Kompensationsvorrichtung den Gangunterschied zwischen den Wellenzügen, die durch das eine Objektiv hindurchgehen oder hindurchgegangen sind, und den Wellenzügen, die durch das andere Objektiv hindurchgehen oder hindurchgegangen sind, periodisch verändert, oder daß die Objektive eine periodische Bewegung durchführen.
12. Rastermikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Interferenzveränderungsmittel mit der Steuer- und/oder Regelelektronik der Rasterung und/oder mit der Signalverarbeitungselektronik ihrer Funktion rückgekoppelt und/oder abgestimmt ist.
13. Rastermikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Signal mit Hilfe einer Sample-Elektronik (Lock-in, Boxcar-Integrator o.ä.) weiter verarbeitet wird und daß der Sample-Takt mit Hilfe eines interferometrischen Aufbaus mit mindestens einem Lichtdetektor gewonnen wird, oder daß der Sample-Takt vom optischen Aufbau unabhängig ist, oder daß der Sample-Takt von Signalen bezogen wird, welche die Interferenzveränderungsmittel steuern oder regeln.
14. Rastermikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Signalauswertung zumindest teilweise mit einer elektronischen Datenverarbeitungsmaschine (Computer) erfolgt.
15. Rastermikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Vorrichtung zur Veränderung der Amplitude in den Beleuchtungs- und/oder den Detektionsstrahlengängen vorgesehen ist.
16. Rastermikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Vorrichtung vorhanden

ist, welche Wellenfrontaberrationen, die insbesondere durch Deckgläser oder Probe entstehen, zumindest teilweise kompensieren.

17. Rastermikroskop nach mindestens einem der
vorherigen Ansprüche, 5
dadurch gekennzeichnet,
daß die zur Objektebene optisch konjugierten
Blenden entfernbar und/oder austauschbar
und/oder in ihrer Öffnung variabel und/oder 10
beweglich, d. h. Translation und/oder Rotation
sind.
18. Rastermikroskop nach mindestens einem der
vorherigen Ansprüche, 15
dadurch gekennzeichnet,
daß zusätzlich optische Elemente mit mindestens einem Lichtdetektor angeordnet sind,
insbesondere um zusätzlich zum doppelkonfo-
kalen Bild, ein Bild mit konventioneller oder 20
herkömmlich konfokaler Auflösung zu erhalten.

25

30

35

40

45

50

55

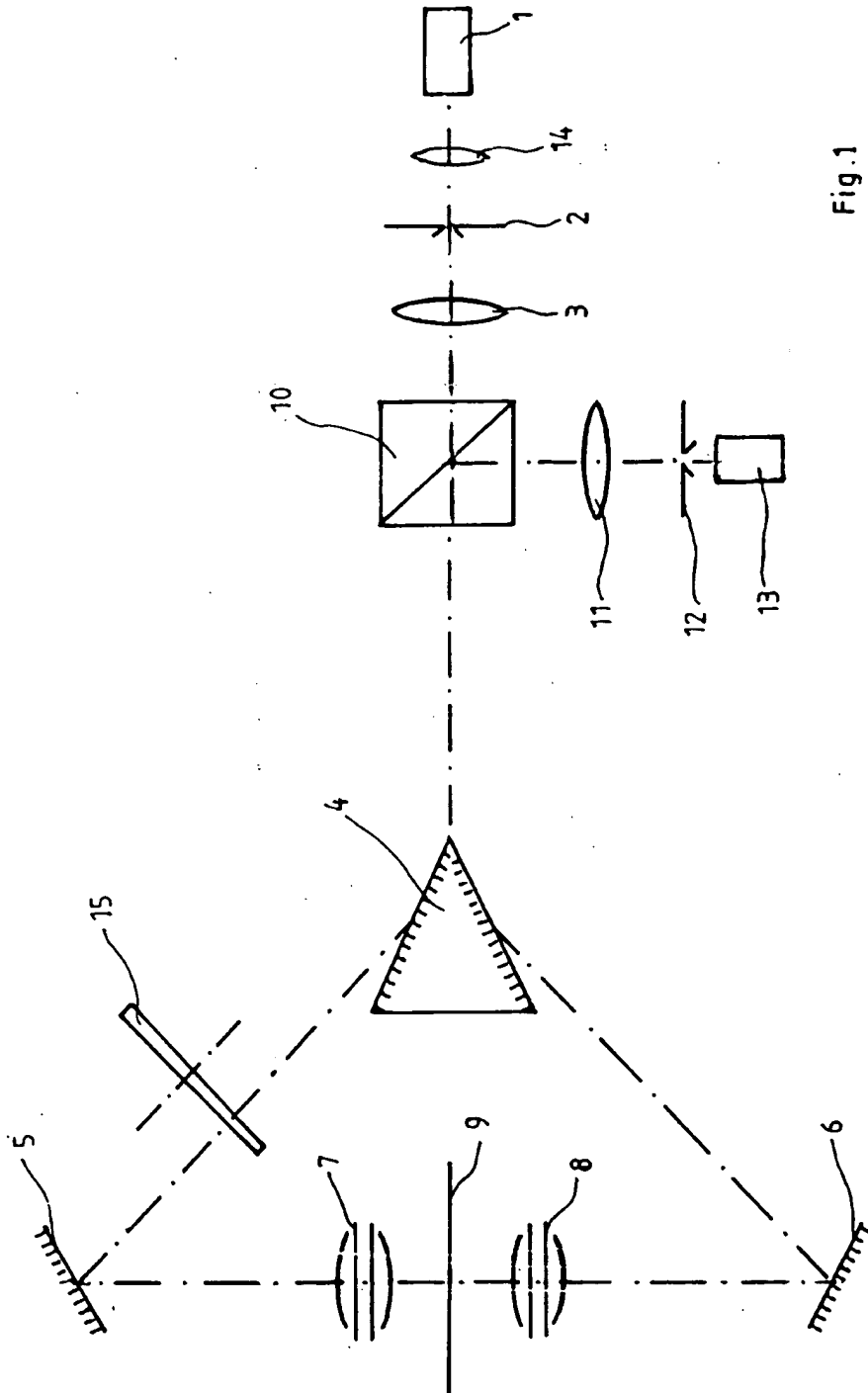


Fig.1

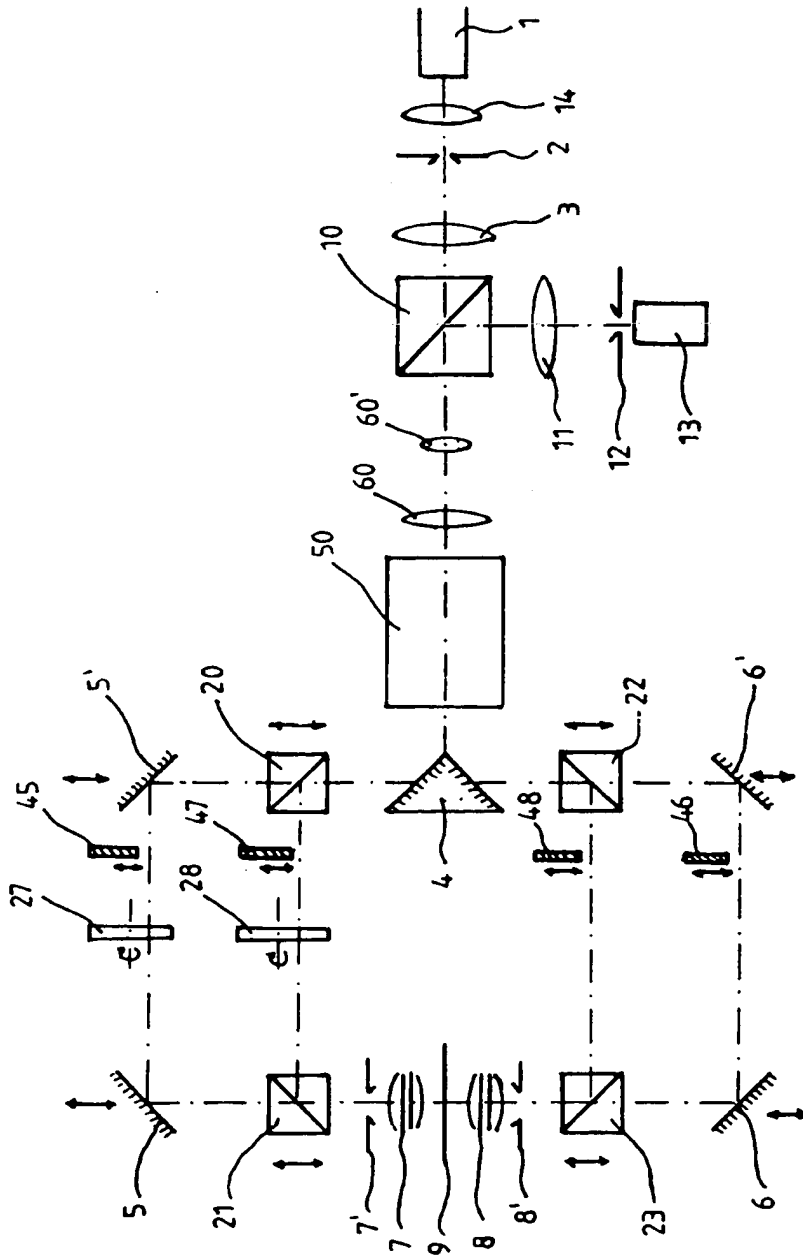


Fig. 2

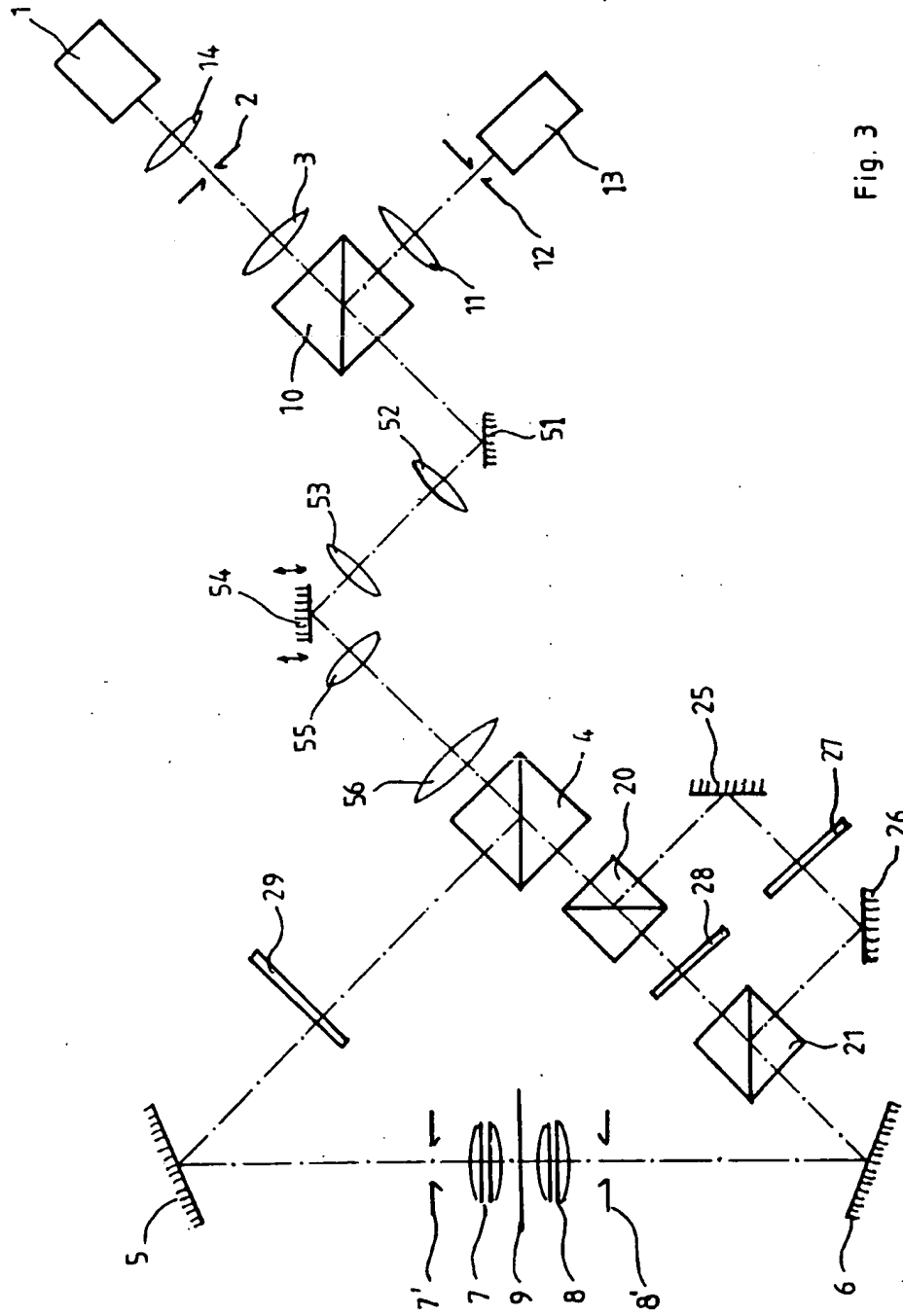


Fig. 3

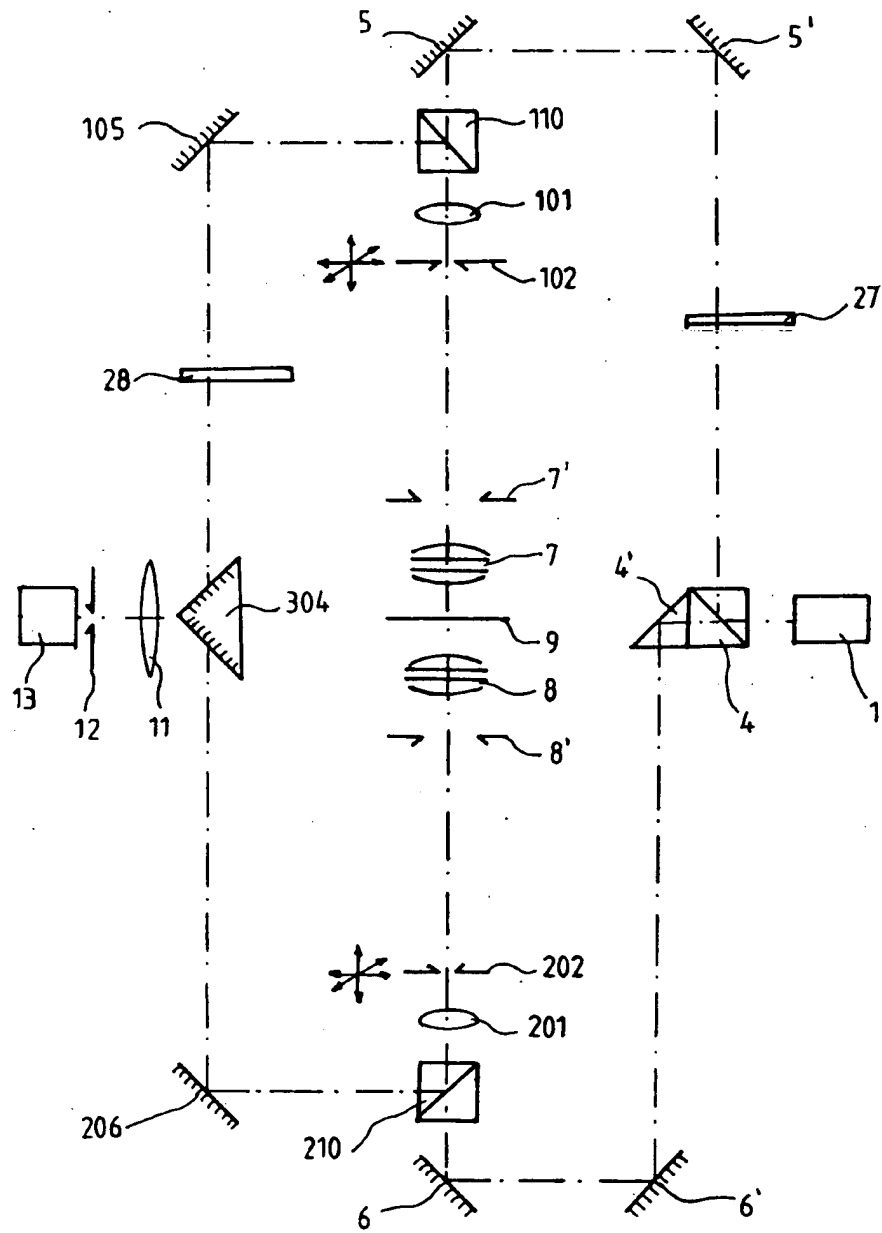


Fig. 4



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 91 12 1368

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.5)
Y	OPTICA ACTA Bd. 27, Nr. 5, 1980, LONDON GB Seiten 611 - 624; SHEPPARD ET AL.: 'MULTIPLE TRAVERSING OF THE OBJECT IN THE SCANNING MICROSCOPE' * Seite 614 - Seite 615 *	1-6, 8	G02B21/00
Y	OPTIK. Bd. 73, Nr. 1, 1986, STUTTGART DE Seiten 30 - 33; STELZER ET AL.: 'A SETUP FOR A CONFOCAL SCANNING LASER INTERFERENCE MICROSCOPE' * Seite 31 *	1-6, 8	
A	APPLIED PHYSICS LETTERS. Bd. 55, Nr. 17, 23. Oktober 1989, NEW YORK US Seiten 1707 - 1709; JOHNSON ET AL.: 'IMAGE FORMATION IN A SUPERRESOLUTION PHASE CONJUGATE SCANNING MICROSCOPE' * Seite 1707; Abbildungen 1, 3 *	1-6, 8, 16	
A, D	DE-A-3 918 412 (JENOPTIK JENA GMBH) * Spalte 2, Zeile 44 - Spalte 3, Zeile 59; Abbildung 1 *	1, 3	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.5) G02B
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 11, no. 32 (P-541)30. Januar 1987 & JP-A-61 202 102 (HITACHI) 6. September 1986 * Zusammenfassung *	1, 2, 5-7	
A	JOURNAL OF PHYSICS E. SCIENTIFIC INSTRUMENTS. Bd. 22, Nr. 8, August 1989, ISHING, BRISTOL GB Seiten 532 - 547; WILSON: 'TECHNIQUES OF OPTICAL SCANNING MICROSCOPY' * Seite 532; Abbildung 2 *	12-14	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchert BERLIN		Abschließdatum der Recherche 28 FEBRUAR 1992	Prüfer VONMORS F.
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung als solches betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur I : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			